

## 個体発生と系統発生から見た色素細胞発生機構

著者	矢嶋 伊知朗
号	44
学位授与番号	1896
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/38892">http://hdl.handle.net/10097/38892</a>

氏名・(本籍)	や じま い ち ろ う 矢 嶋 伊知朗
学位の種類	博 士 (理 学)
学位記番号	理博第1896号
学位授与年月日	平成13年3月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科, 専攻	東北大学大学院理学研究科(博士課程)生物学専攻
学位論文題目	個体発生と系統発生から見た色素細胞発生機構
論文審査委員	(主査) 教授 井 出 宏 之 教授 水 野 健 作 助教授 山 本 博 章

## 論 文 目 次

### 用語一覧

#### I. 序章

##### 序 序論

色素細胞の分子生物学  
脊椎動物色素細胞の進化  
本研究の目的  
目的の意義

#### II. 研究-1: メラノサイトとRPEの異なる発生メカニズム-*Mitf*遺伝子の細胞種特異的 isoform がもたらす機能的差異-

Introduction  
Materials and Methods  
Results  
Discussion

#### III. 研究-2: 色素細胞発生メカニズムの進化-*Mitf*の出現と機能分化-

Introduction  
Materials and Methods  
Results  
Discussion

#### IV. 研究-3: RPE細胞発生における遺伝子カスケード-*Mitf*遺伝子発現を制御する遺伝子-

Introduction  
Materials and Methods  
Results  
Discussion

## V. 総論

### 謝辞

### References

# 論文内容要旨

## I. 序章

動物の色彩、と聞いて我々がまずイメージするものは、極楽鳥の荘厳さや、アゲハチョウの美しさ、ヤドクガエルの毒々しさ、といった、「体色のイメージ」である。もちろん動物が持つ体色パターンは、誘引、擬態、危険信号、威嚇といった重要な役割を担っている。しかし、体色パターンがもたらす重要性以外にも色というのは、視覚、聴覚にはじまり、紫外線防御や体温調節といった役割を果たしている。動物、特に脊椎動物においてこのように重要な色を作り出すシステムは、色素細胞と呼ばれる特殊に分化した細胞集団が担っている。そしてこの色素細胞の精密な発生システムがパターンを生み出し、視覚を与え、太陽からの強烈なエネルギー波から身を守ってくれるのである。

色素細胞は特異な細胞である。そして、色素細胞の発生メカニズムには、一つの遺伝子が大きく関わっている。その遺伝子は色素細胞誕生の鍵となる遺伝子であり、名を *Mitf*、という。本研究では、1) 脊椎動物 *Mitf* 遺伝子の新たな機能、そして2) *Mitf* 遺伝子を中心とした色素細胞発生メカニズムが、進化という悠久の時の流れの中でどのように変化していったのか、更には、3) 脊椎動物において、*Mitf* 遺伝子の発現をコントロールする因子の新たな候補を明らかにする。

## II. 研究-1: メラノサイトとRPEの異なる発生メカニズム-*Mitf* 遺伝子の細胞種特異的 isoform がもたらす機能的差異-

私は、マウス *Mitf* 遺伝子座に異常を持つ突然変異体マウスの一つ、*Mitf<sup>mi-bw</sup>* (*black-eyed white*) マウスの分子生物学的解析を行った。*Mitf<sup>mi-bw</sup>* マウスは、neural crest 由来のメラノサイトと、眼杯由来のRPE (retinal pigmented epithelium) 細胞という、2つの発生系譜を持つ脊椎動物色素細胞のうち、メラノサイトの発生の上に異常を生じる。このマウスの解析を行うことにより、新たな、*Mitf* による細胞系譜特異的な分化機構が明らかになると考えた（一部の結果は修士論文作成時に得られたが、説明を補完するため、改訂し、掲載した）。

## Results & Discussion

私は今回、*Mitf<sup>mi-bw</sup>* マウスの色素細胞の発生異常が、*Mitf* 遺伝子座の intron 3 に約 7.2 kbp の L1 element (L1<sub>mi</sub>) の挿入により生じていることを明らかにした。

定量 RT-PCR を用いた実験により、*Mitf* 遺伝子の発現に異常が生じていること、さらに alternative splicing によって生じる *Mitf* isoform それぞれで、異常に差が存在することを示した。RPE で特に強い発現を示す *Mitf*-A 及び心臓で強く発現する *Mitf*-H mRNA のうち、full-length *Mitf*-A, -H の発現は減少し、exon 2-4 が欠損した転写産物は逆に増加する。しかし、full-length *Mitf*-A, -H も減少しながらも十分な発現をしていると思われる。一方、メラノサイトで強く発現する *Mitf*-M の発現は、野生型では正常型の mRNA のみが発現し、*Mitf<sup>mi-bw</sup>* マウスでは完全にその発現は阻害される。

今回の研究により、*Mitf<sup>mi-bw</sup>* マウスにおいて、どのようにしてメラノサイトだけが失われてしまうのか、その分子メカニズムが明らかとなった。これにより、*Mitf*-M がメラノサイトの発生に必須の isoform であ

り、Mitf-HとMitf-AはRPEの発生に必須だがメラノサイトの発生には関与していないことが示唆された。このように、色素細胞の発生には*Mitf*遺伝子のisoformによる細胞種特異的な機能的役割が存在することが明らかとなった。

### III. 研究-2: 色素細胞発生メカニズムの進化-Mitfの出現と機能分化-

我々脊椎動物の色素細胞の発生メカニズムはどのような進化を辿り、現在のようなシステムになったのだろうか？この疑問を明らかにするために、我々は脊椎動物ではないが、近縁な原索動物の一種であるマボヤを用いた解析を行った。今回、*Mitf*遺伝子のマボヤホモログを単離し、その遺伝子の*in vivo*における機能解析を行った。さらに、脊椎動物の眼の発生に必須である*Pax6*遺伝子のマボヤホモログを単離、同様の解析を行った。

### Results & Discussion

*HrMitf*遺伝子の発現は、後期神経胚期及び初期尾芽胚期では、強い発現はたった2つの割球（色素細胞前駆体）に限定される。これらの細胞では、脊椎動物色素細胞におけるメラニン産生に機能する*tyrosinase*, *Tyrp*遺伝子のマボヤホモログである*HrTyr*, *HrTyrp*遺伝子が発現している(Sato et al., 1997; Sato et al., 1999)。また、*HrPax6*遺伝子も色素細胞前駆体での強い発現が観察された。さらに、脳胞予定領域の中でも特に前側領域での強い発現が観察された。

*HrMitf* mRNAをマボヤ受精卵に強制発現させると、*HrTyr*タンパク質の発現が中胚葉性細胞に異所的に誘導された。この結果は、脊椎動物の*Mitf*と同様、*HrMitf*が*tyrosinase*の発現を誘導しうることを示唆している。内在的な*HrPax6*の機能を阻害するコンストラクトである、En-R-*HrPax6*融合タンパク質の強制発現実験により、色素細胞の発生する数の増減が観察され、脳胞領域の細胞が胚外へ飛び出す個体も観察された。脳胞領域で作用していると思われる*HrPax6*遺伝子の機能は、脊椎動物*Pax6*遺伝子の機能と共通しており、脊椎動物における*Pax6*遺伝子が関わる眼及び脳の発生メカニズムは、マボヤにおいても保存され、脊椎動物誕生以前から既に獲得されていたと推測される。

今回単離した*HrMitf*遺伝子がコードするタンパク質のN末端は、*Mitf*-Aや-Hに共通に存在するdomainと相同性が高い。また、マボヤ受精卵に*Mitf*-M、-A、及び-H mRNAをそれぞれ強制発現させた場合、*Mitf*-Aだけが、*HrTyr*タンパク質の異所的発現を誘導した。この結果は、*HrMitf*遺伝子が、脊椎動物のRPEで強い発現を示す*Mitf*-Aの祖先の遺伝子と共通の機能を保持していることを示唆している。私は今回の研究により、以下のような色素細胞の進化モデルを提唱する。1) 色素細胞の進化の過程において、RPE細胞が進化的により早い時代に出現した。2) さらにそのRPE細胞の発生では、脊椎動物の*Mitf*-Aに相同な、原始的*Mitf*遺伝子が機能していた。3) そして原始的な脊椎動物が出現し、neural crest細胞という新たな細胞集団を獲得した際に、*Mitf*-Mに相同なisoformが生まれ、その細胞系譜特異的な機能発現によりメラノサイトという新たな色素細胞が誕生した。

### IV. 研究-3: RPE細胞発生における遺伝子カスケード-Mitf遺伝子発現を制御する遺伝子-

現在様々な研究室において、*Mitf*遺伝子の機能が詳細に研究されている。また、*Mitf*遺伝子の発現を制御する因子に関する研究も行われつつある。ショウジョウバエ*orthodenticle (otd)*遺伝子(Finkelstein and Perrimon, 1991)の脊椎動物ホモログの一つである*Otx2*遺伝子は眼胞で発現(Boncinelli and Mallamaci, 1995)し、やがて眼杯が形成されると、予定RPE細胞にのみ発現するようになる。このことから、*Otx2*は、*Mitf*遺伝子を介したRPE細胞分化のための遺伝子カスケードの上位に位置し、*Mitf*遺伝子の転写を制御する遺伝子であると考え、*Otx2*遺伝子のRPE細胞における機能解析をニワトリ胚を用いて行った。

## Results & Discussion

今回、*Otx2*発現ベクター(p*Otx2*)を用いたRPE細胞への強制発現実験を行い、RPE細胞の肥厚が観察されたが、*Mitf*タンパク質の強い発現が観察されたことから、*Otx2*遺伝子の過剰発現によりRPE細胞の増殖が活性化された結果であることが示唆される。また、NR（網膜神経）細胞への*Otx2*遺伝子の強制発現は、目立った形態的变化は観察されなかった。さらに、NR細胞のマーカー遺伝子である*Chx10*遺伝子の発現にも変化は観察されなかった。

ショウジョウバエ*Engrailed*タンパク質のrepressor (En-R) domainを持つ*Otx2*との融合タンパク質を発現するベクター(pEnR-*Otx2*)を導入することにより、*Otx2*遺伝子の機能を阻害し、それにより形態変化と遺伝子発現の変化を解析した。その結果、1) RPE細胞は本来一層であるが、導入した領域は肥厚していた。また、NR領域は湾曲した領域が観察された。2) pEnR-*Otx2*を導入したRPE細胞では、*Mitf*タンパク質の発現が強力に阻害されていた。しかし、NR細胞における*Chx10*遺伝子の発現には変化は認められなかった。3) pEnR-*Otx2*を導入したRPE細胞では、*Chx10*遺伝子の異所的発現は観察されなかった。4) pEnR-*Otx2*を導入したRPE細胞は異常な増殖を見せ、メラニン産生も失われた。*Otx2*遺伝子の機能阻害は、RPE細胞の色素細胞以外の細胞へ分化転換を引き起こしていると考えられる。今回の*Otx2*遺伝子の眼形成における発現と機能に関する解析により、*Otx2*遺伝子がRPE細胞の分化に重要な役割を担っていること、そしてそれは*Mitf*遺伝子の発現調節に寄与することによるものであることが強く示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

個体発生分子機構の解明とその系統解析は生物学的に重要な課題である。矢嶋伊知朗提出の論文は、色素細胞分化機構を一つのモデルシステムとして、我々が持つ二つの色素細胞系譜、すなわち、間脳由来の網膜色素上皮および神経冠に由来するメラニン産生細胞であるメラノサイトを分化させる分子機構の解明とその系統解析を目的としている。

本人はまず最初に、bHLH-LZ型の転写因子をコードし、これら色素細胞系譜の両方に深く関わる小眼球症遺伝子(*mi*: microphthalmia, 最近では *Mitf*: microphthalmia-associated transcription factor と呼ばれる)に着目した。本人は、black-eyed white(黒眼白毛色)と呼ばれる当該遺伝子座の突然変異 *Mitf*<sup>mi-bw</sup> の作用機序の解析から、当該遺伝子座より発現するいくつかのアイソフォームのなかで *Mitf*-M と呼ばれるものがメラノサイトの発生に必須であること、一方網膜色素上皮の発生にはこれを必須とせず、他のアイソフォームの発現が必要であることを強く示唆した。この発見は、二つの色素細胞系譜の違いを分子レベルで明らかにした最初の報告であり国内外ですでに高く評価されている。

本人はさらに原索動物マボヤから *Mitf* ホモログをクローニングし、系統的な機能解析を行い、脊椎動物の網膜色素上皮で高発現する *Mitf*-A アイソフォームが原始的な特徴を残していることを示唆した。

また網膜色素上皮の発生に関わる *Mitf* 遺伝子の上流で *Otx* 遺伝子が機能していることを示唆する結果も得た。

これらの研究から本人は、我々が持つ色素細胞系譜は、まず網膜色素上皮を分化させる分子機構の原始型が生み出され、その後に神経冠細胞からメラノサイトを分化させる機構が創出される際に、*Mitf*-M をコードする遺伝子構造が作り出され、現在の系譜を保証するにいたっている、とのモデルを提唱した。

以上の成果は新しい知見、またモデルであり、色素細胞発生機構の進化を考察する際の重要な基礎データを提供しており、当該分野への貢献が著しい。従ってこの論文は博士論文として適当であり、著者がこの分野において自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。よって、矢嶋伊知朗提出の論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。